

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Marge Arge

**NER-i valkude osa homoloogilise rekombinatsiooni
toimumisel *Pseudomonas putida* kromosoomis**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: MSc Julia Sidorenko,

PhD Maia Kivisaar

TARTU 2014

Sisukord

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1. DNA kahjustuste teke ja SOS-vastus.....	7
2. Nukleotiidi väljalõike reparatsioon NER.....	10
2.1 NER-süsteem <i>E. coli</i> rakkudes.....	11
2.1.1 Kahjustuse tuvastamine	11
2.1.2 Kahjustuse kõrvaldamine ja uue ahela süntees	11
2.2 Mfd valgu osalus NER-is	13
2.2 NER perekonna <i>Pseudomonas</i> rakkudes	15
3. Rekombinatsiooniline reparatsioon.....	16
3.1 Homoloogiline rekombinatsioon HR.....	16
3.1.1 Presünaptiline faas	19
3.1.2 Sünaptiline faas	21
3.1.3 Postsünaptiline faas	21
3.2 Mittehomoloogsete DNA-otste ühendamine NHEJ	22
4. Mutatsiooniprotsessid ja rekombinatsioon nälgivates bakterirakkudes	24
5. Rekombinatsiooni uurimise testsüsteemidest	25
EKSPERIMENTAALOSA.....	27
6. Töö eesmärk.....	27

7. Materjal ja metoodika	28
7.1 Söötmed ja bakteritüved	28
7.2 Kromosomaalne testsüsteem homoloogilise rekombinatsiooni sageduse uurimiseks <i>Pseudomonas putida</i> rakkudes.....	29
7.3 Homoloogilise rekombinatsiooni toimumissageduse määramine.....	31
8. Tulemused.....	32
8.1 Kromosoomisiselt toimuv homoloogiline rekombinatsioon bakteris <i>Pseudomonas putida</i>	32
8.2 NER-i valkude mõju rekombinatsiooni toimumissagedusele.....	34
ARUTELU.....	36
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40
KIRJANDUSE LOETELU	42
KASUTATUD VEEBILEHEKÜLJED.....	51
LIHTLITSENTS	52

Kasutatud lühendid

AP sait	apuriinne/apürimidiinne koht
bp	aluspaar (<i>base pair</i>)
BER	läämastikaluse väljalõike reparatsioon (<i>base excision repair</i>)
CAA	<i>casamino acids</i>
CFU	kolooniat moodustav üksus (<i>colony forming unit</i>)
DSB	kaheaheelaline katke (<i>double strand break</i>)
dsDNA	kaheaheelaline DNA (<i>double strand DNA</i>)
GGR	globaalne genoomi reparatsioon (<i>global genome repair</i>)
Glc	glükoos (<i>glucose</i>)
HR	homoloogiline rekombinatsioon (<i>homologous recombination</i>)
kb	tuhat aluspaari (<i>kilo base</i>)
<i>lac</i>	laktoos (<i>lactose</i>) (töös <i>lac</i> operon- laktoosi lagundamises osalevaid valke kodeerivate geenide promootor)
MMR	valepaardumise reparatsioon (<i>mismatch repair</i>)
NER	nukleotiidi väljalõike reparatsioon (<i>nucleotide excision repair</i>)
NHEJ	mittehomoloogiline DNA-otste ühendamise (<i>non-homologous end joining</i>)
Phe	fenool (<i>phenol</i>)
ROS	reaktiivne hapniku ühend (<i>reactive oxygen species</i>)
Sm ^r	streptomütsiini suhtes resistentne
SSB	üheaheelaline katke / üheaheelalisele DNA-le seonduvad valgud (<i>single strand break / single-strands binding protein</i>)
ssDNA	üheaheelaline DNA (<i>single strand DNA</i>)
TCR	transkriptsioonist sõltuv reparatsioon (<i>transcription- coupled repair</i>)
Tel ^r	tetratsükliini suhtes resistentne

TRCF	transkriptsiooni reparatsiooniga siduv faktor (<i>transcription-repair coupling factor</i>)
<i>trp</i>	trüptofaan (<i>tryptophan</i>)
UV	ultraviolett

Sissejuhatus

DNA reparatsiooni käigus kõrvaldatakse DNA ahelast valepaardumisi, ühe- ja kaheaheelalisi katkeid. Kahjustuste põhjused võivad olla nii rakuvälised (kiirgus, kemikaalid) kui ka –sisesed (reaktiivsed hapnikühendid, DNA replikatsiooni käigus tekkivad vead). Parandamata jäävad kahjustused kinnistuvad mutatsioonidenä. Muutuvad ja ebasoodsad keskkonnatingimused põhjustavad bakteritele pidevalt stressi, mille tulemusel peatub rakkude kasv ja jagunemine. Sellistes mittejagunevates ehk statsionaarse faasi rakkudes põhjustavad vigutegevate DNA polümeraaside läbiviidav DNA süntees ja reparatsioonisüsteemide alatalitus mutatsioonisageduse tõusu. Kuna paljud mutatsioonid on kahjulikud, on DNA reparatsioonisüsteemide korrektne toimimine rakkudele oluline.

Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (NER) on väga laia vigade parandamise spetsiifikaga DNA reparatsioonimehhanism, mille abil saab eemaldada DNA konformatsiooni muutvaid DNA kahjustusi. Homoloogiline rekombinatsioon (HR) on rakkudes kasutatav peamiselt ühe- ja kaheaheelaliste katkete kõrvaldamiseks. Lisaks võimaldab HR ka horisontaalset geeniülekanne, suurendades geneetilist varieeruvust. Genoomi terviklikkuse säilitamise seisukohalt on oluline rekombinatsiooniprotsessi täpsus. Rekombinatsioonilist reparatsiooni mõjutavad mitmed keskkonnategurid ja teised DNA reparatsioonisüsteemid.

Varasemalt on meie laboris selgitatud HR mehhanisme, kus HR toimub plasmidi ja kromosoomi vahel, kuid ei ole uuritud mehhanisme, mis mõjutavad HR toimumist kromosoomi erinevate osade vahel. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida NER-i valkude mõju rekombinatsioonisagedusele bakteri kromosoomis mullabakteri *Pseudomonas putida* näitel, kasutades selleks testsüsteemi, mis võimaldab uurida HR-i kromosoomisiselt.

Kirjanduse ülevaade

1. DNA kahjustuste teke ja SOS-vastus

DNA kahjustused võivad bakterirakus tekkida nii elutegevuse tulemusena kui ka väliste kahjustavate tegurite toimetel. Elutegevuse käigus ehk endogeenselt tekkivad kahjustused on põhjustatud reaktiivsete hapniku- ja alküülühendite, replikatsioonivigade kui ka spontaansete lämmastikaluste modifikatsioonide (nt desamiinimiste) poolt. Väliskeskkonna teguritest avaldavad enim mõju ioniseeriv ja mitteioniseeriv kiirgus ja mitmed mutageense toimega kemikaalid (Krwawicz jt., 2007; Shrivastav jt., 2010).

Kiirgused, millest olulisimaks kahjustuste tekitajaks on UV-kiirgus (mitteioniseeriv), põhjustavad DNA ühe- ja kaheahlalisi katkeid (*single-strand break*- SSB ja *double-strand break* – DSB) ja DNA-ahelas kõrvutiasetsevate pürimidiinide vahel ristsidemete ehk 6-4 fotoproduktide teket.

Aeroobses keskkonnas elavatel bakteritel moodustuvad hingamisahela reaktsioonides ja oksüdatsiooniprotsessides reaktiivsed hapniku radikaalid (*reactive oxygen species*- ROS), mis enamasti lagundatakse või neutraliseeritakse. Kui mingil põhjusel see ei õnnestu, võivad ROS-id kahjustada DNA lämmastikaluseid ja suhkrujääke, põhjustades SSB-de ja DSB-de teket, ristsidemete teket teiste molekulidega ja lämmastikaluste modifikatsioone (Dizdaroglu, 1992; Cabiscol jt., 2000).

DNA replikatsioonil tekib üldiselt vähe vigu, 10^{-9} – 10^{-11} iga sünteesitud bp kohta (Drake et al., 1998). Korrektne replikatsioon tagatakse rakus nii DNA polümeraaside vigu korrigeeriva (*proof-reading*) 3' 5' eksonukleasne aktiivsusega, mis eemaldab valesti paardunud lämmastikaluse kui ka postreplikatiivse valepaardumise reparatsiooniga (*mismatch-repair*- MMR) (Fijalkowska et al., 2012; Kunkel, 2004).

Kahjustuse parandamata jätmisel viga kinnistub ning akumulereb mutatsioonina, kandudes rakujagunemisel edasi tütarakkudesse. Raku ellujäämist ohustavate vigade korral indutseeritakse rakus SOS-vastus (Patel et al., 2010). *E. coli*-s kirjeldatud SOS-vastuse tulemuseks on enam kui 40 geeni transkriptsiooni aktiveerimine (Fernandez de Henestrosa et

al., 2000; Courcelle et al., 2001). Nende geenide poolt kodeeritud valgud osalevad mitmetes reparatsioonimehhanismides. Andmaks rakule aega kahjustuste likvideerimiseks aktiveeritakse Sula valk, mis takistab raku jagunemist (Patel et al., 2010).

DNA kahjustuste kõrvaldamiseks on erinevaid strateegiaid: (1) vea parandamine kohapeal (nt fotoreaktivatsioon, metüülrühma kõrvaldamine); (2) väljalõikereparatsioon; (3) DNA rekombinatsioonist sõltuv reparatsioon. Reparatsioonisüsteemid toimivad mitmete valkude koostööl, mistõttu on raku jaoks oluline ka neid valke kodeerivate geenide funktsionaalsuse tagamine.

Väljalõike reparatsiooni korral toimub DNA ahelas vea parandamine valesti paardunud lämmastikaluse kõrvaldamisega. Eristatakse lämmastikaluse väljalõike (*base excision repair* - BER), nukleotiidi väljalõike (*nucleotide excision repair* – NER) ja valepaardumise reparatsiooni (*mismatch repair* – MMR). Väljalõikereparatsiooni mehhanismide puhul tunnevad endonukleaasi kompleksid ära kahjustunud või valesti paardunud lämmastikaluse. BER-is tunnevad DNA kahjustuse ära DNA glükosülaasid (Fromme jt., 2004), mis eemaldavad valestipaardunud lämmastikaluse DNA lämmastikaluse ja suhkrufosfaadi vahele N-glükosiidsideme hüdrolüüsamise teel (Posnick ja Samson, 2001). Eemaldatud lämmastilause kohale jääb AP koht (apuriinne/apürimidiinne koht). Seejärel lagundavad AP endonukleaasid AP kohas 5' fosfodiastersideme, jättes alles 3'-OH ja 5'-desoksüriboos fosfaadi. Lõpuks sünteesib tühimiku täis DNA polümeraas I ja otsad ühendab DNA ligaas (Zharkov, 2008; Kanamitsu ja Ikeda, 2010). MMR puhul kõrvaldatakse ja sünteesitakse uuesti terve lõik DNA-ahelast. NER-süsteemi kirjeldan täpsemalt järgmises peatükis.

Rekombinatsioonilise reparatsiooni puhul toimub DNA ühe- või kaheahhaliste katkete kõrvaldamine DNA lõikude vahetamise teel. Rekombinatsioon võib toimuda täielikult homoloogilise DNA osalusel (homoloogiline rekombinatsioon ehk HR) või mittehomoogiliste DNA-otste ühendamise teel (*non-homologous end joining* - NHEJ) (Lieber jt., 2004).

Olukorras, kus DNA-kahjustuste parandamine ei ole enam võimalik, toimub vigaderohke replikatsioon kahjustunud DNA-lt. Vigaderohket replikatsiooni teostab DNA polümeraas V (Pol V), millel puudub vigu korrigeeriv aktiivsus. Korrigeeriva aktiivsuse puudumise tõttu võib lisanduda uusi vigu.

2. Nukleotiidi väljalõike reparatsioon NER

NER on üks tähtsamaid DNA reparatsioonisüsteeme, mis võimaldab DNA ahelast eemaldada suuri, DNA konformatsiooni mõjutavaid kahjustusi (Reardon ja Sancar, 2005; Van Houten jt., 2005). Enamasti kasutatakse NER-i just UV-kiirguse ja alküülivate ühendite, vähemal määral ka oksüdatiivse stressi poolt põhjustatud kahjustuste korral (Lin ja Sancar, 1989).

NER toimub mitmeetapiliselt - esmalt tuntakse ära DNA kahjustus, seejärel tehakse üksikahelalised lõiked mõlemale poole kahjustust, kõrvaldatakse kahjustust sisaldav fragment ning lõpuks sünteesitakse selle asemele uus DNA lõik ja ligeeritakse see vana DNA ahela otsaga (van Hoffen, 2003). Prokariootides eemaldatakse NER-i poolt vea kõrvaldamiseks 12-13 nukleotiidi, eukariootides 24-32 nukleotiidi pikkuseid DNA lõike (Reardon ja Sancar, 2005). Kokku osaleb NER-i läbiviimises 4 Uvr valku (UvrA, UvrB, UvrC, UvrD) ja uue DNA ahela sünteesiks on vajalikud ka DNA polümeraas I ja DNA ligaas (Sancar ja Reardon, 2004). NER-süsteemi ning selles osalevate valkude funktsioone on enim uuritud *E. coli* rakkudes.

Bakteritel jagatakse NER kahte alaklassi. Transkriptsioonist sõltuv reparatsioon (*transcription- coupled repair- TCR*) tagab transkribeeritava DNA ahela kiire parandamise (Le Page et al., 2000). TCR on oluline transkriptsiooni peatumist põhjustavate kahjustuste eemaldamisel (van Hoffen jt., 2003). Globaalne genoomi reparatsioon (*global genome repair- GGR*), mis toimub transkriptsioonist sõltumatult, parandab vigu ka mittekodeerivatel aladel ning on võrreldes TCR-ga aeglasem (Hartman and Ford, 2002).

2.1 NER-süsteem *E. coli* rakkudes

NER süsteemi valkude funktsioonid *E. coli* rakkudes on ära toodud tabelis 1.

2.1.1 Kahjustuse tuvastamine

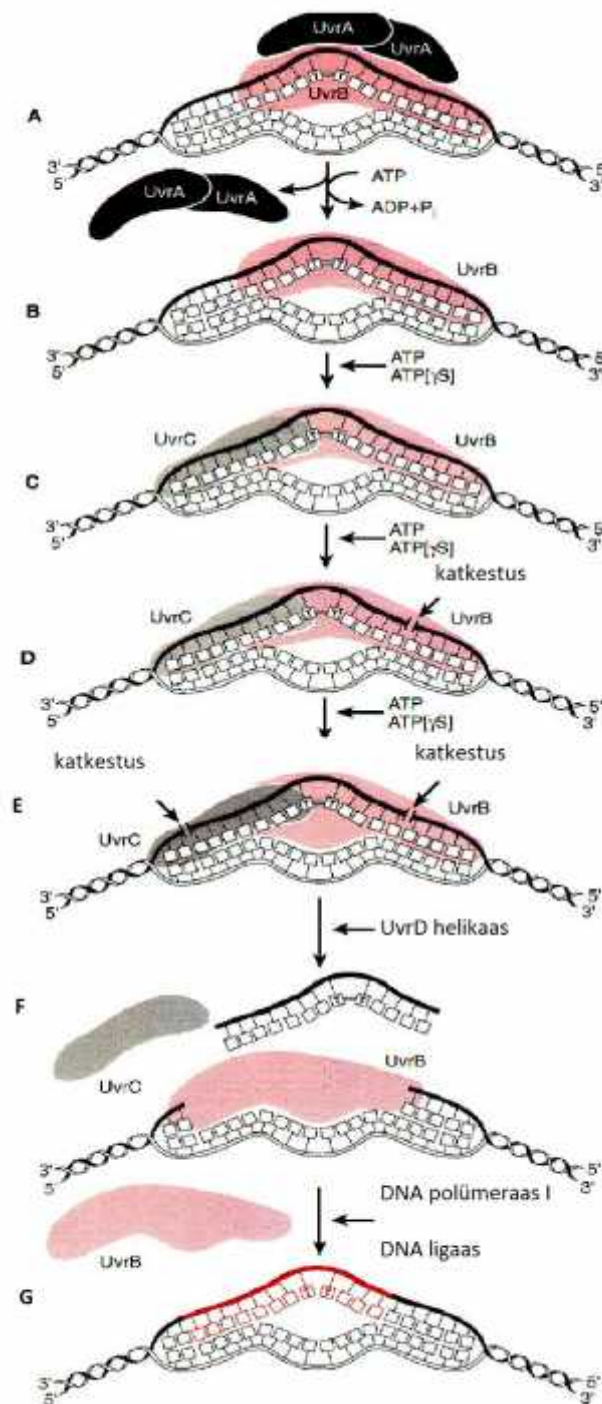
E. coli-s toimub kahjustuse äratundmine ATP-sõltuva reaktsiooni käigus moodustunud UvrA₂B heterotrimeeri kompleksi vahendusel (Orrel ja Sancar, 1989). Esmalt lokaliseerib UvrA dimeer kahjustuse (DellaVecchia jt, 2004) ning seejärel moodustub kahjustuse kõrvaldamiseks UvrB ja kahjustust sisaldava DNA osa vaheline kompleks (Grossman ja Thiagalingam, 1993). UvrB helikaasne aktiivsus harutab seejärel DNA ~ 5 bp ulatuses lahti. Selle tulemusel toimuv DNA-ahela konformatsiooniline muutus soodustab UvrB-DNA stabiilse kompleksi moodustumist nii, et üks DNA ahel paikneb UvrB DNA-d siduva osa ja kahjustust äratundva domääni vahel ja on eksponeeritav UvrC endonukleaaasile. UvrC seostumiseks on vajalikud konformatsioonilised muutused reparatsioonikompleksis, millega kaasneb UvrA dimeeri dissotseerumine kahjustuse kohalt (Orrel ja Sancar, 1989; Delaquette jt., 2002). Kahekordne (esalt UvrA ja seejärel UvrB poolt läbiviidav) kahjustuse äratundmine on vajalik, sest UvrB ei ole võimeline dsDNA-ga seonduma ega dsDNA-l kahjustust tuvastama.

2.1.2 Kahjustuse kõrvaldamine ja uue ahela süntees

Kahjustusti sisaldava fragmendi eemaldamiseks seondub UvrB-DNA kompleksiga UvrC endonukleaaas, mis teeb kahjustuse kohast DNA katked 3' ja 5' suunas (Orren ja Sancar, 1989). Seejuures teostab 3' lõiget UvrC N-terminaalses osas paiknev domään ning 5' lõike eest vastutab sama valgu C-terminaalses osas paiknev domään (Moolenaar jt., 1998). On näidatud, et suuremate kahjustuste korral ei ole UvrC võimeline 3' lõiget teostama. Sel juhul ei saa järgmised NER süsteemi valgud toimida ja kahjustus jääb kõrvaldamata (Zou jt., 1995).

Pärast üheaahelaliste katkete teostamist UvrC endonukleaaas eraldub, võimaldades UvrD helikaasi seostumist. UvrD eemaldab kahjustust sisaldava 12-13 bp pikkuse DNA lõigu ja ka ssDNA-ga seotuks jäänud UvrB valgud (Orren jt., 1992). Tekkinud üheaahelalise lõiguga

seondub DNA polümeraas I, mis sünteesib alles jäänud ahelaga komplementaarse ahela. Vastsünteesitud fragment ühendatakse ülejäänud DNA ahelaga DNA ligaasi abil (Sibghat-Ullah jt., 1990; Van Houten jt., 2005). NER-i üldine toimemehhanism on toodud joonisel 1.



Joonis 1. NER süsteem
(Friedberg ja Hanawalt; 1984)

- A) UvrA₂B heterotrimeeri seostumine kahjustust sisaldavale DNA osale
- B) UvrA₂ eemaldumise järel asub UvrB helikaas kaksikahelat ~5 bp ulatuses lahti harutama.
- C) UvrC seostumine.
- D) UvrC N-terminaalne ots teostab 3'-lõike.
- E) UvrC C-terminaalne ots teostab 5'-lõike.
- F) UvrC eraldub võimaldades UvrD helikaasi seostumist. Katkestust sisaldav DNA fragment eemaldatakse.
- G) ssDNA-ga seotuks jäänud UvrB eraldub, DNA polümeraas I sünteesib uue ahela ning DNA ligaas ühendab vastusünteesitud fragmendi ülejäänud ahelaga.

NER süsteemi valkude defektsuse korral ei ole süsteem võimeline oma eesmärgi täitma. Kuigi mõningad uuringud on näidanud, et *uvrA* ja *uvrB* geenide defektsused avaldavad mutatsioonisagedusele statsionaarse faasi rakkudes vähe mõju (Foster, 1999; Bridges 1998), on osades katsetes *E. coli* puhul näidatud, et nende geeniproduktide puudumine põhjustab näljastressi tingimustes kuni 10^4 korda suuremat mutatsioonisagedust (Hall, 1995). Samas on meie laboris *P. putida* puhul näidatud seda, et osade NER-i valkude puudumisel mutatsioonisagedus statsionaarse faasi rakkudes hoopis väheneb, mis viitab sellele, et NER-iga kaasnev DNA süntees võib olla vigaderohke ja mutatsioonide allikaks statsionaarse faasi rakkudes (Tark jt., 2008).

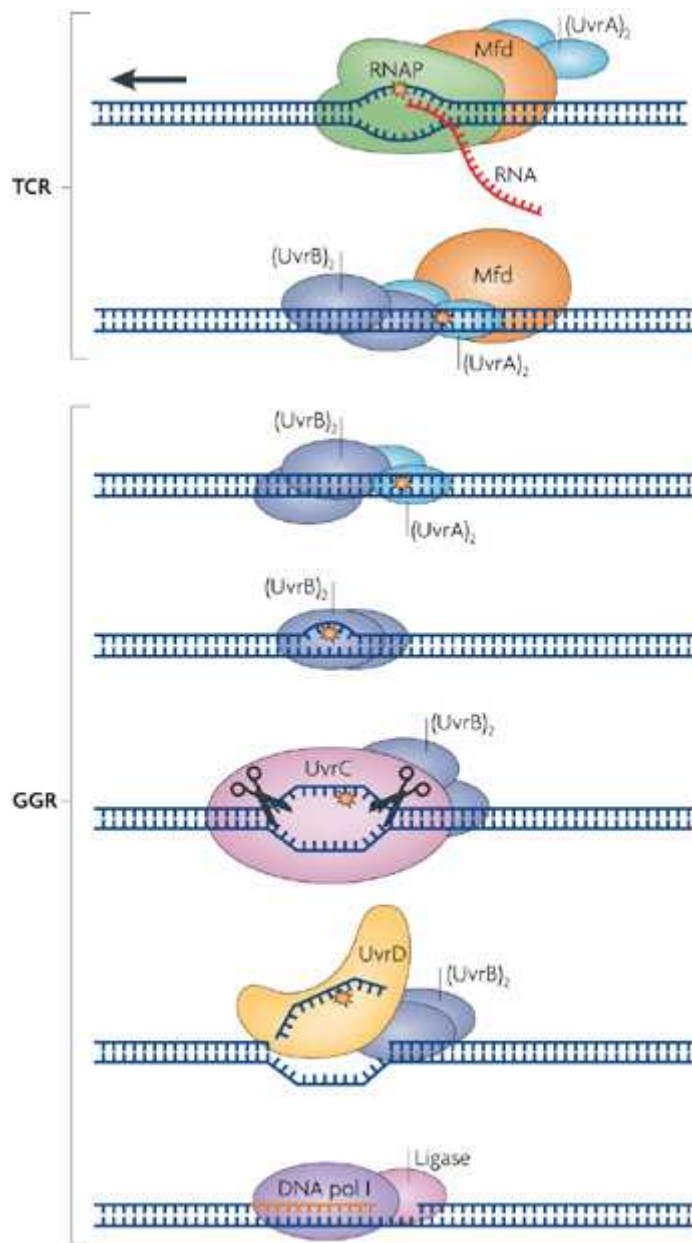
Tabel 1. NER süsteemi valgud *E. coli* rakkudes

Valk	Roll NER süsteemis
UvrA	Primaarne DNA kahjustuse äratundmine
UvrB	Sekundaarne DNA kahjustuse äratundmine; DNA-ahelate lahtiharutamine
UvrC	Sisselõigete teostamine kahjustusest 3` ja 5` suunas
UvrD	Kahjustust sisaldava DNA fragmendi eemaldamine

2.2 Mfd valgu osalus NER-is

Mfd on transkriptsiooni reparatsiooniga siduv faktor (*transcription-repair coupling factor*-TRCF). Defektideta DNA-l soodustab Mfd RNA elongatsiooni (Park jt., 2002), sest abistab RNA polümeraasi edasiliikumisel. Kahjustuse esinemise korral RNA polümeraas peatub. Mfd tunneb peatunud RNA polümeraasi ära, lükkab seda DNA-l edasi kuni RNA polümeraas saab vabaneda ja soodustab NER-i valkude seostumist kahjustunud DNA-le UvrA-ga interakteerumise kaudu (Park jt, 2002; Savery, 2007).

Joonisel 2 on ära toodud Mfd osalus NER-i initsiatsioonis.



Joonis 2. Mfd osalus NER-i käivitamisel (Hanawalt ja Spivak, 2008).

RNA polümeraas (RNAP) peatub kahjustuse kohal ja pole võimeline RNA elongatsiooni jätkama. Mfd tunneb peatunud RNAP-i ära, eemaldab ta DNA-lt, seondub UvrA valguga käivitades nii NER-i ja eraldub ise kompleksist. Edasi toimub NER nagu eelnevalt juba kirjeldatud.

2.3 NER pseudomonaadides

Kuigi *E. coli*'s läbiviidud uuringute tulemusena on saadud arvestataval hulgal informatsiooni NER-i ja teiste SOS-vastuse tulemusel käivitavate reparatsioonimehhanismide kohta, ei ole nende põhjal võimalik teha üldistusi kõigi bakterite kohta. Näiteks *Pseudomonas* perekonna esindajatel puuduvad DNA polümeraasi V kodeerivad geenid. Ka fotolüaasi osalus UV-kiirgusest tekkinud kahjustuste eemaldamisel on osutunud minimaalseks (Kim ja Sundin, 2001). *P.aeruginosa* rakkudes ei sõltu UvrA ja UvrB ekspressioon DNA kahjustuste olemasolust (Rivera jt., 1997, 1996). *P. syringae* puhul on näidatud UvrA defektsete rakkude märgatavat elumuse langust UV-B kiirgusele eksponeerimisel (Gunasekera ja Sundin, 2006) ning selle põhjal on väidetud, et NER on pseudomonaadidel arvestatavaks UV-kiirguse mõjul tekkinud kahjustuste kõrvaldajaks.

Nagu juba eespool mainitud, on NER-i osalust kirjeldatud lisaks DNA reparatsioonile ka spontaansete mutatsioonide tekkesageduse tõusus statsionaarse faasi rakkudes (Tark jt., 2008).

3. Rekombinatsiooniline reparatsioon

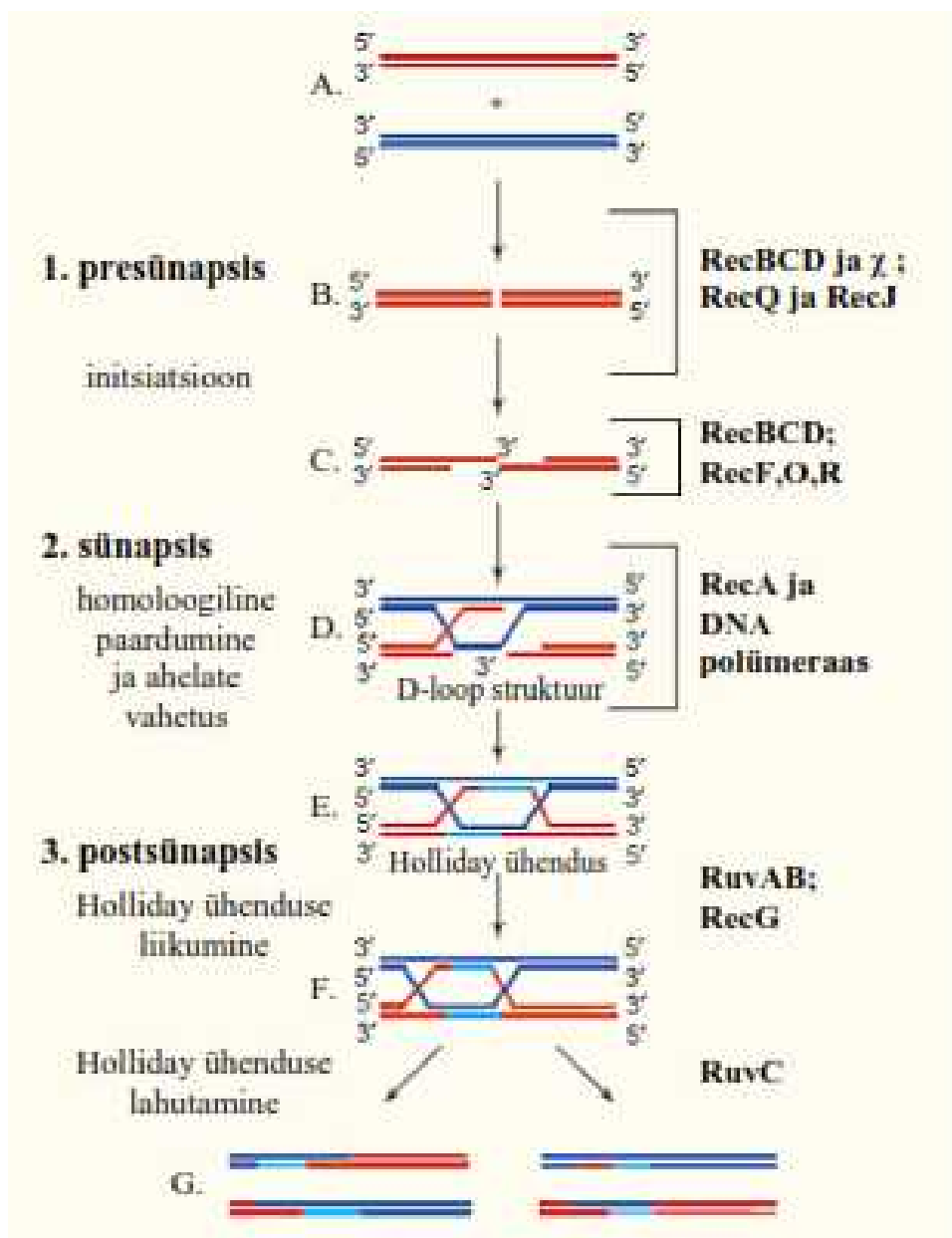
Ühe- ja kaheaahelised katked võivad rakkudele osutada letaalseks, sest DNA polümeraasid ei ole võimelised katkeid ületama ja replikatsioonikahvel kollabeerub (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008). Rekombinatsioonist sõltuva reparatsiooni (*recombination-dependent repair*) korral toimub eksogeense või raku enda DNA molekuli homoloogia abil DNA katkete kõrvaldamine. Transformatsiooni või konjugatsiooni teel rakku sattunud võõr-DNA kasutamine rekombinatsioonis on bakterite horisontaalse geeniülekanne aluseks (Rocha jt., 2005). Raku enda DNA molekulide vaheline rekombinatsioon aitab tagada geneetilise stabiilsuse.

3.1 Homoloogiline rekombinatsioon- HR

Homoloogiline rekombinatsioon (HR) on konserveerunud kõigis elusorganismides ning selle käigus toimub osaliselt homoloogiliste või identsete DNA fragmentide vahetus DNA molekulide vahel. Kuna matriitisina kasutatakse kahjustumata DNA molekuli, on uute vigade tekketõenäosus väike. *E. coli* rakkudes toimub homoloogilise rekombinatsiooni teel üheaahelaliste katkete parandamine RecFOR ja kaheaahelaliste katkete parandamine RecBCD raja kaudu (Kowalczykowski jt., 1994). Mõlema raja puhul on eristatavad kolm faasi:

- 1) Initsiatsioon ehk presünaps, mille käigus tekitatakse ssDNA (*single-strand* DNA) ahel
- 2) Sünap, kus toimub homoloogiliste DNA regioonide paardumine ja ahelate vahetus
- 3) Postsünaps, mille rekombinatsioonilised vahevormid lahutatakse (Nowosielska, 2007; Lanka ja Pansegrau, 1999).

Homoloogilise rekombinatsiooni üldmudel on ära toodud joonisel 3 ja osalevad valgud *E. coli* rakkude näitel tabelis 2.



Joonis 3. Homoloogilise rekombinatsiooni üldmudel (Kowalczykowski, 2000).

Vasakul on ära toodud homoloogilise rekombinatsiooni etapid ja igas etapis toimuv olulisim protsess. Paremal on nimetatud igas etapis osalevad olulisimad valgud. Joonisel on punasega tähistatud kahjustust sisaldav DNA, sinisega homoloogiline järjestus, millega rekombinatsioon toimub ja helesinisega uued sünteesitud osad.

Tabel 2. Homoloogilisel rekombinatsioonil osalevad valgud *E. coli* rakudes

Valk	Aktiivsus
Presünaptiline faas	
RecBCD	dsDNA eksonukleas ja 3' 5' helikaas (RecB) ja helikaas (RecD). Nukleasne aktiivsus on reguleeritud saidiga (äratundmise eest vastutab RecC)
RecJ	5' 3' ssDNA eksonukleas
RecQ	3' 5' DNA helikaas
Sünaptiline faas	
RecA	DNA-sõltuv ATPaasne aktiivsus, ssDNA ja dsDNA-ga seondumine, homoloogilise DNA-ga paardumine ja ahelate vahetus
RecF	dsDNA ja ssDNA-ga seonduv valk, mis soodustab RecA seostumist ssDNA-le.
RecO	Soodustab RecA seostumist ssDNA-le, seostub RecR valguga.
RecR	Soodustab RecA seostumist ssDNA-le, seostub RecR ja RecO valkudega.
SSB	ssDNA-le seostuv valk, mis takistab DNA sekundaarstruktuuride teket, kaitseb DNA-d nukleaside eest.
Postsünaptiline faas	
RuvA	Seostub Holliday ühendusega, vahendab RuvB seostumist DNA-le.
RuvB	Tagab koos RuvA-ga Holliday ühenduste liikumist 5' 3' suunas; helikaasse aktiivsusega.
RuvC	Endonukleas, lõikab Holliday ühendusi
RecG	Soodustab Holliday ühenduste liikumist 3' 5' suunas; helikaas.

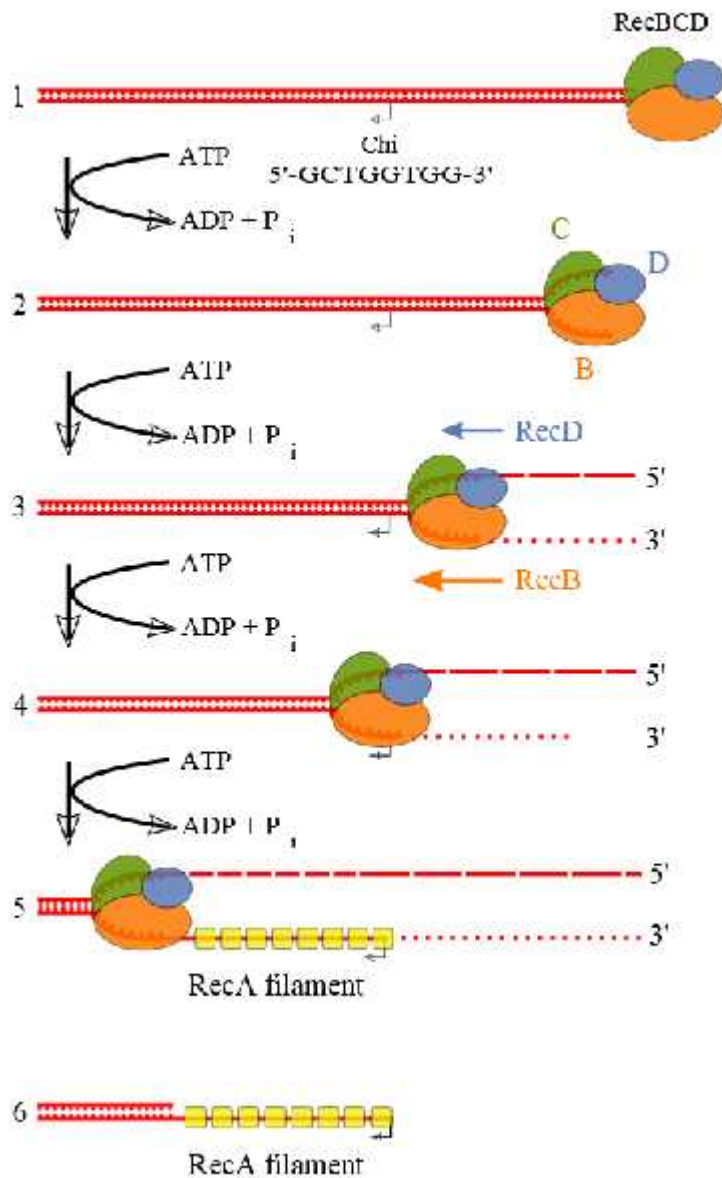
3.1.1 Presünaptiline faas

Homoloogilise rekombinatsiooni initsiatsiooniks on vajalik ssDNA, mis tekib RecBCD heterotrimeerse ensüümi toimel RecBCD rajas või RecQ ja RecJ ensüümide toimel RecFOR rajas. Presünaptilise faasi eesmärgiks on luua tingimused RecA valgu seondumiseks sünaptilises faasis, et oleks võimalik homoloogiliste DNA ahalate paardumine ja vahetus (Lanka ja Pansegrau, 1999).

RecBCD multiensüümkompleksis on RecB subühikul nukleasne ja 3' → 5' helikaasne aktiivsus, RecD subühikul 5' → 3' helikaasne aktiivsus ja RecC vastutab DNA skanneerimise ja (*crossover hotspot instigator* Chi) järjestuse äratundmise eest. RecBCD kompleks seondub dsDNA katkele ja liigub ahelaid lahti keerates ning lagundades kuni saidini (Nowosielska, 2007). on 8-nukleotiidiline asümmeetriline järjestus 5'-GCTGGTGG-3', mida *E. coli* genoomis leidub keskmiselt iga 4,5 kb järel (El Karoui jt., 1999). Nimetatud saidist alates jätkub ahelate lahti keeramine ning vaid 5' → 3' suunas ahela lagundamine (Nowosielska, 2007). Seejärel laetakse tekkinud vaba 3'OH otsa RecA valk. Moodustunud RecA-DNA nukleoproteiinfilament (Lanka ja Parsegrau, 1999) on vajalik homoloogilise DNA järjestuse leidmiseks sünaptilises faasis (Bianco ja Kowolczykowski, 2001). RecBCD raja presünaptiline faas on ära toodud joonisel 4.

RecFOR rajas vastutavad RecA valgu seondumiseks sobiliku ssDNA substraadi tekitamise eest RecQ ja RecJ. RecQ on helikaasse ja RecJ 5' → 3' eksonukleasse aktiivsusega (Cox, 2007; Nowosielska, 2007). RecA-DNA filamendi moodustumise eest vastutavad RecF, RecO ja RecR, mis asendavad üheaahelalisele DNA-le seondunud SSB valgud (*single-strand binding protein*) RecA valkudega. RecBCD raja defektsuse korral võib homoloogilise rekombinatsiooni initsiatsioon toimuda dsDNA katkelt ka RecFOR raja kaudu (Zahradka jt., 2006).

Sünaptiline ja postsünaptiline faas toimuvad mõlemas rajas ühesuguselt.



Joonis 4. RecBCD raja presünaptiline faas (Handa jt., 2005).

RecBCD kompleks seondub dsDNA katke kohale (1) ning liigub ahelaid lahti keerates ja lagundades 3'-saidi suunas (2 ja 3). 5'-saidini jõudes jätkub ahelate lahti keeramine ning vaba 5'otsaga ahela lagundamine (4). Edasi vahendab RecBCD RecA valkude seostumist tekkinud ssDNA-le (5). Selle tulemusena moodustub RecA-DNA nukleoproteiinne filament (6), mis sünaptilises faasis vastutab homoloogilise DNA leidmise eest.

3.1.2 Sünaptiline faas

Presünaptilises faasis moodustunud RecA-DNA nukleoproteiinfilamendis on RecA aktiveeritud olekus ning vahendab homoloogilise DNA leidmise eest (Wyman jt., 2004). On näidatud, et rekombinatsiooni toimumiseks vajalik homoloogilise DNA pikkus on *in vivo* minimaalselt 23-40 ja *in vitro* 15 nukleotiidi (Bianco ja Kowalczykowski, 2001). Homoloogilise ahela leidumisel toimub selle paardumine RecA valkudega kaetud ssDNA ahelaga (Kowalczykowski, 2000). Presünaptilises faasis tekkinud tühimikud täidetakse DNA polümeraas I poolt. Pärast ahelate vahetumist ja tühimike täitmist tekib rekombinatsiooni vahevormina Holliday struktuur (*Holliday junction*) (Heyer, 2004).

3.1.3 Postsünaptiline faas

Postsünaptilises faasis toimub Holliday struktuuri edasiliikumine homoloogilise piirkonna ulatuses ja algsete DNA ahelate vaheliste ühenduste kadumise teel (Lanka ja Pansegrau, 1999). Nimetatud ühenduste eemaldamise eest vastutavad RuvABC kompleks ja RecG helikaas (Kuzminov, 1999). RuvABC kompleks koosneb RuvA tetrameerist, RuvB heksameerist ja RuvC dimeerist (West jt., 1998), mis seostuvad Holliday struktuuriga juba kohe pärast selle moodustumist. RuvAB valgud liigutavad Holliday struktuuri ühendust 5' 3'suunas edasi, kuni RuvC tunneb ära ühenduse ristumispunkti kindla järjestuse (Kowalczykowski, 2000; Bianco ja Kowaloczykowski, 2001; Eggleston ja West, 2000). Ristumispunkti jõudes teeb RuvC endonukleas ühendustesse üheahelalised katked, mille tulemusel tekivad rekombinantset DNA molekulid (Lanka ja Pansegrau, 1999).

RecG on DNA-sõltuv valk, mis liigutab Holliday ühendusi 3' 5' suunas ning kasutab ühenduste lahutamiseks RuvABC-st sõltumatut mehhanismi (West, 1996; Kowacykowski, 2000; Kuzminov, 1999).

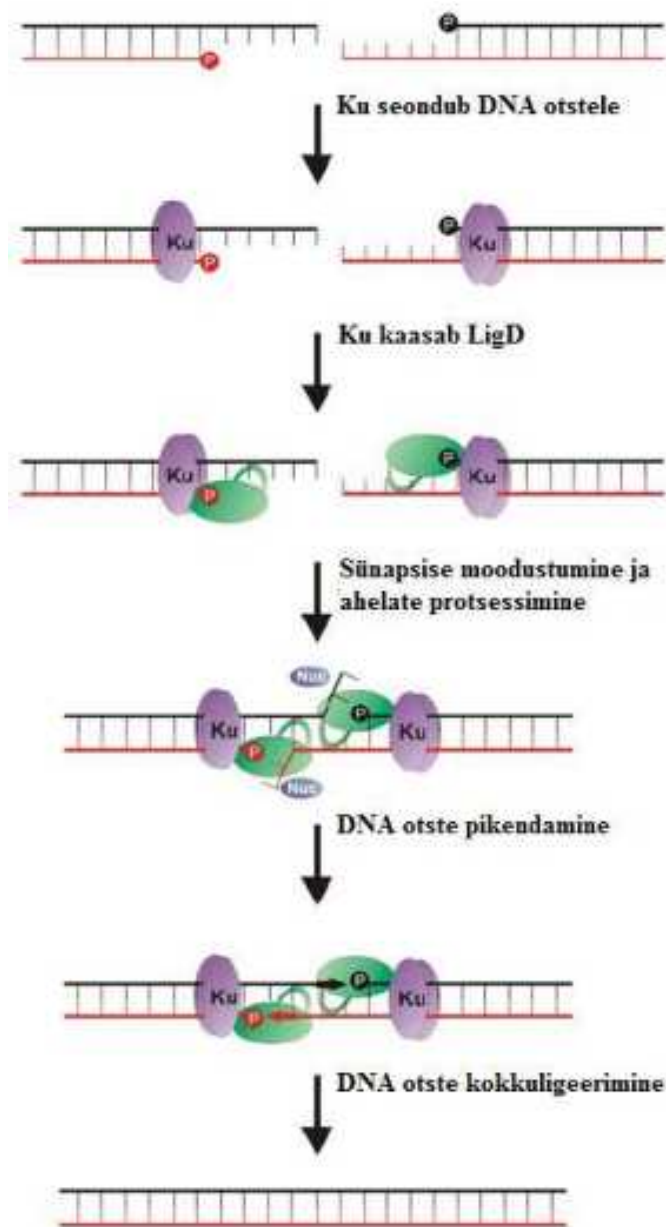
3.2 Mittehomoloogiliste DNA otste ühendamine NHEJ

NHEJ rekombinatsiooni toimumiseks ei ole homoloogilise DNA ahela olemasolu vajalik. Kuigi on näidatud, et ahelate kokkusobitamisel võidakse kasutada mikrohomoloogiat (Della jt., 2004), toimub protsess enamasti matriits-sõltumatult ja on seetõttu suhteliselt vigaderohke (Pitcher jt., 2007; Shuman ja Glickman, 2007), põhjustades kuni 50% juhtudest mutatsioone (Aniukwu jt., 2008). Pikka aega arvati, et NHEJ ei toimu prokarüootides, sest *E. coli* genoomis puuduvad NHEJ läbiviimiseks vajaminevaid valke kodeerivad geenid (Lieber, 2010). Laialdasem bakterigenoomide uuring on aga näidanud vastupidist (Aravind ja Koonin, 2001; Doherty jt., 2001). Arvatakse, et NHEJ-raja geenid olid algselt kõikide bakterite genoomides olemas, kuid on osadest evolutsiooni käigus kadunud (Bowater ja Doherty, 2006; Brissett ja Doherty, 2009) või on need omandatud horisontaalse geeniülekanne käigus.

Kuigi enamasti kasutatakse NHEJ rada dsDNA katkete parandamiseks, oletatakse, et NHEJ süsteemil on ka oluline roll statsionaarse faasi mutageneesis (Pitcher jt., 2007).

Prokarüootses NHEJ rajas osaleb kaks valku - Ku ja LigD. Ku on homodimeerne ringstruktuuriga valk, mis tuvastab dsDNA katke ja seostub katke otstele. Sellele järgneb ATP-sõltuva DNA ligaasi LigD seostumine (Aravind ja Koonin, 2001; Weller ja Doherty, 2001). LigD on mitmest domäänist koosnev multifunktsionaalne valk, millel on tuvastatud polümeraasne, ligaasne ja fosfoesteraasne aktiivsus (Shuman ja Glickman, 2007). LigD seostumine toimub valgu polümeraasse domääni vahendusel, kusjuures vajalik on vaba 5' - fosfaatrühma olemasolu DNA katkestuse kohal. Seejärel moodustub Ku ja LigD abil sünap, kus mittehomoloogsed DNA otsad viiakse kokku. Selliselt stabiliseeritud DNA-l on võimalik LigD fosfoesteraasse aktiivsuse toimele viia läbi DNA otste protsessing. LigD polümeraasse domääni abil on võimalik pikendada DNA ahelate otsi, et täis sünteesida tühikud ühinemiskohas. Otste ühendamist katalüüsib LigD ligaasse aktiivsusega domään.

Prokarüootides toimuva NHEJ raja etapid on välja toodud joonisel 5.



Joonis 5. NHEJ rada prokariöotides (Brissett ja Doherty, 2009).

Ku valk tuvastab dsDNA katke, seostub DNA ahelate otstele ning vahendab LigD seostumist 5' vabale fosfaatotsale. Ku-LigD kompleks vahendab ahelate ühendamist. LigD polümeraase aktiivsusega domään pikendab DNA ahelate otsi vajaliku pikkuseni ning ligaasse aktiivsusega domään ühendab DNA otsad.

4. Mutatsiooniprotsessid ja rekombinatsioon nälgivates bakterirakkudes

Lisaks kõikidele teistele väliskeskkonna kahjustavatele mõjudele võib mutatsioonisagedust suurendada bakterite näljastress, mis viib DNA reparatsioonimehhanismide efektiivsuse languseni ja vähendab DNA replikatsiooni täpsust (Foster, 1999, Kim jt., 2001). Lisaks suureneb ka spontaansete mutatsioonide tekkesagedus (Kasak jt., 1997; Saumaa jt., 2002). On näidatud, et vigaderohkete DNA polümeraaside (PolIV ja PolV) suhtes defektsed bakterid on nälgivas populatsioonis väiksema konkurentsivõimelisusega kui neid polümeraase omavad bakterid (Tark jt., 2005; Yeiser jt., 2002). Statsionaarses faasis toimuvaid mutatsiooniprotsesse on peetud nii stressitingimustes kuhjuvate vigade loomulikuks tagajärjeks (Bridges, 1998) kui ka väljakujunenud kohastumust suurendavaks mehhanismiks (Rosenberg jt., 1998).

Meie laboris on uuritud mitmete DNA reparatsioonisüsteemide ning nendes osalevate valkude funktsioone seoses statsionaarse faasi mutageneesiga bakteris *P. putida* (Kivisaar, 2010).

NER ja MMR süsteemid osalevad nälgivates *P. putida* rakkudes DNA reparatsioonil ning on defektsuste korral võimelised üksteist toetama (Tark, 2006, magistritöö; Tark jt., 2008). Neist uuringutest on selgunud, et kui NER-i süsteemi UvrA defektsuse korral suudab MMR hoida mutatsioonisageduse algtüvega sarnasel tasemel, siis MMR-i MutS-i defektsuse korral mutatsioonide tekkesagedus tõuseb. Seega on MMR rakkudes võrreldes NER-iga efektiivsem kahjustuste kõrvaldaja.

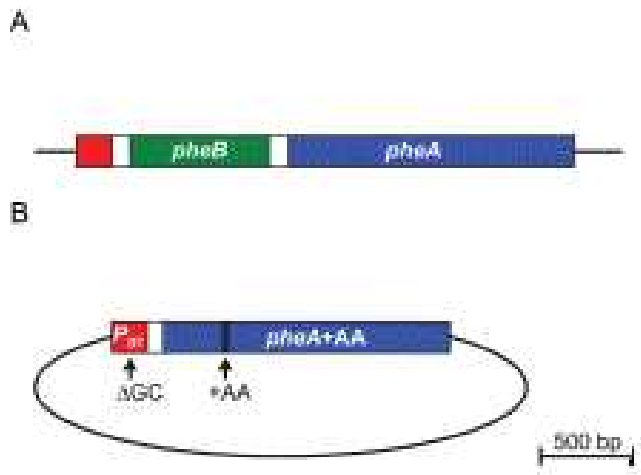
Katren Mikkil on oma magistritöös näidanud, et NER ja MMR osalevad statsionaarses faasis rekombinatsioonilise reparatsiooni mehhanismide kontrollis, kuid ei vastuta rekombinatsioonisageduse tõusu eest hilises statsionaarses faasis. Samas töös on välja toodud ka, et rekombinatsioonisagedust tõstavad enam vabad reaktiivsed hapnikuühendid kui süsinikunälg, kuigi ka kestev süsinikunälg suurendab homoloogilise rekombinatsiooni toimumise sagedust (Tavita jt., 2012). Selle põhjuseks võib pidada ROS-ide suuremat osalust kaheahalaliste katkete tekitamisel võrreldes vigaderohke reparatsiooniga.

5. Rekombinatsiooni uurimise testsüsteemidest

Suurem osa uuringuid homoloogilise rekombinatsiooni regulatsiooni ja teiste reparatsioonisüsteemide valkude mõjust rekombinatsioonisündmustele on läbi viidud konjugatsiooni, transduktsiooni või transformatsiooni teel rakku viidud võõr-DNA-d kasutades (Veaute jt., 2005, Birge jt., 1974, Bichara jt., 2006, Hoffmann, 1992). Kuna looduses on bakterite kasv ja jagunemine ebasoodsate keskkonnaolude tõttu pärsitud (Baath jt., 1998, Poulsen jt., 1995) on loodud testsüsteeme ka statsionaarse faasi rakkude mutageneesi uurimiseks (Foster, 1999).

Homoloogilise rekombinatsiooni uurimiseks statsionaarse faasi *P. putida* rakkudes on meie laboris varasemalt konstrueeritud kromosomaalsest ja plasmiidsest osast koosnev testsüsteem (Tavita jt., 2012), milles kromosomaalne osa sisaldab promootorita *pheBA* operoni ja plasmiidne osa konstitutiivse promootori kontrolli all olevat mittefunktsionaalset *pheA* geeni (joonis 6).

Nimetatud testsüsteemi kasutades on näidatud, et MMR valgud suruvad statsionaarse faasi rakkudes toimuvat rekombinatsiooni maha. Samas ei ole neid valke kodeerivate geenide defektsus statsionaarse faasi rakkudes toimuvate HR sündmuste sageduse tõstjaks (Tavita jt., 2012). Samas uurimuses on välja toodud ka oletus, et genoomi lokaalne struktuur mõjutab plasmiidse osa rekombineerumist antud piirkonda.



Joonis 6. Homoloogilise rekombinatsiooni uurimise testsüsteemi osad (Tavita jt., 2012).

Testsüsteem koosneb kahest osast. (A) Kromosomaalse osa moodustab *P. putida* kromosoomis paiknev mittefunktsionaalne promootoriga *pheBA* operon. (B) Plasmiidse osa moodustab mittefunktsionaalne +2 raaminihkega (+AA) *pheA* geen (*pRPpheA+2*), mille promootoralast deleteerunud GC nukleotiidipaar muutis promootori funktsionaalseks, viies promootori -35 ja -10 elemendid teineteisest optimaalsele kaugusele.

Eksperimentaalosa

6. Töö eesmärk

DNA kahjustuste kõrvaldamiseks ja seeläbi mutatsioonide ärahoidmiseks on bakterirakkudes välja kujunenud mitmed reparatsioonimehhanismid. Meie laboris on varem näidatud, et ebasoodsates kasvutingimustes tõuseb bakterirakkudes spontaansete mutatsioonide tekkesagedus (Kasak jt., 1997, Saumaa jt., 2002). Mittejagunevates ehk statsionaarse faasi rakkudes toimuvad mutatsioonid suurendavad geneetilist varieeruvust ning võimaldavad uute oludega adapteerumist.

E. coli mudeli põhjal on uuritud rekombinatsiooniprotsessis osalevate valkude osalust statsionaarse faasi rakkudes punktmutatsioonide tekkel (Layton ja Foster, 2003, He jt., 2005) ning NER-i ja MMR-i valkude mõju rekombinatsioonile kasvavates rakkudes (Matson ja Robertson, 2006, Hanada jt., 2000).

Meie laboris on varasemalt uuritud MMR valkude mõju rekombinatsiooniprotsessidele statsionaarse faasi *P. putida* rakkudes ja näidatud on ka, et fenooli esinemine keskkonnas suurendab nälgivates bakterites HR-i sagedust (Tavita jt., 2012). Lisaks näitasid need varasemad uuringud veel seda, et HR-i sagedus plasmidi ja kromosoomi vahel sõltub testsüsteemi kromosomaalse osa lokaliseerumisest.

Selleks, et selgitada mehhanisme, mis mõjutavad HR-i sagedust kromosoomisiseselt, kasutasime käesolevas töös kaheosalist testsüsteemi, kus mõlemad osad paiknesid kromosoomis, et uurida

- 1) HR-i toimumissagedust kromosoomisiseselt *P. putida* rakkudes
- 2) NER süsteemi valkude mõju HR-i toimumissagedusele
- 3) Kas on erinevusi HR-i mõjutavate faktorite osas, kui võrrelda HR-i toimumist plasmidi ja kromosoomi vahel ning kromosoomisiseselt.

7. Materjal ja metoodika

7.1 Söötmed ja bakteritüved

Täissöötmena kasutasime Luria-Bertani (LB) söödet (Miller, 1972) ja minimaalsöötme valmistamiseks M9 baasil (Adams, 1959). Minimaalsöötmele lisasime veel mikroelementide lahust (2,5 ml/l) (Bauchop ja Elsdén, 1960), aminohapete hüdroolüsaati CAA (*casamino acids*, lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ja süsinikuallikana glükoosi (Glc, lõppkontsentratsiooniga 10 mM) või fenooli (Phe, lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM). Tardsöötme valmistamiseks lisasime söötmele agarit (15 g/l). *P. putida* rakke kasvasime temperatuuril 30°C, vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil. Töös kasutatud bakteritüved on välja toodud tabelis 3.

Tabel 3. Töös kasutatud *P. putida* bakteritüved.

Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
PaW85	Algne <i>P. putida</i> tüvi, identne tüvega KT2440	Bayley jt., 1977
CHR5127	PaW85terphe, mis sisaldab mini-Tn5 koosseisus promootorita <i>pheBA</i> operoni lookuses PP4519 ja P _{tac} promootori all +2 raaminihkega <i>pheA</i> geeni lookuses PP5127 (Sm ^r , Tet ^r)	Sidorenko, J., avaldamata
CHR5127 UvrA	Tüvest CHR5127 deleteeritud <i>uvrA</i>	Sidorenko, J., avaldamata

Tabel 3. Töös kasutatud bakteritüved.

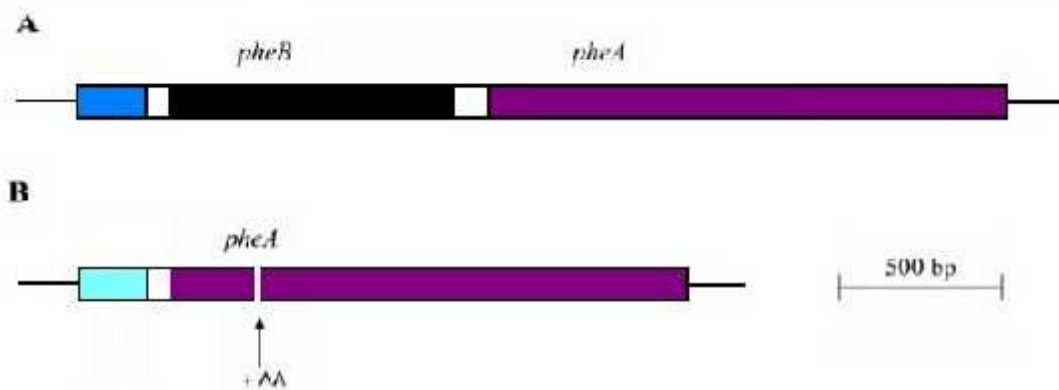
Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
CHR5127 UvrA2	Tüvest CHR5127 deleteeritud <i>uvrA2</i>	Sidorenko, J., avaldamata
CHR5127 UvrB	Tüvest CHR5127 deleteeritud <i>uvrB</i>	Sidorenko, J., avaldamata
CHR5127 UvrMfd	Tüvest CHR5127 deleteeritud <i>mfd</i>	Sidorenko, J., avaldamata

7.2 Kromosomaalne testsüsteem homoloogilise rekombinatsioonisageduse uurimiseks *Pseudomonas putida* rakkudes

Homoloogilise rekombinatsiooni (HR) uurimiseks kasutatud kromosomaalne testsüsteem koosneb kahest osast ja võimaldab määrata *pheA* geeni alleelide vahel toimunud HR-i sagedust *P. putida* rakupopulatsioonis, mis on viidud fenooli sisaldavale minimaalsöötlele. Fenoolil saavad hakata kasvama vaid need rakud, kus HR tagajärjel on töötava promootori all asuv defektne *pheA* alleel vahetunud mittetranskribeerivast operonist pärit funktsionaalse *pheA* alleeliga. Kaheosalise testsüsteemi, kus mõlemad osad paiknevad kromosoomis, koostas ja kirjeldas Julia Sidorenko oma magistritöös (Sidorenko, 2010, magistritöö). Sidorenko tööst on pärit ka joonis 7, mis kujutab mõlemat testsüsteemi osa.

Testsüsteemi aluseks oli varem laboris konstrueeritud *P. putida* PaWterphe tüvi, milles kromosomaalne osa sisaldas promootorita *pheBA* operoni ja plasmiidne osa konstitutiivse promootori kontrolli all olevat mittefunktsionaalset *pheA* geeni (Tavita jt. 2012). *pheA* ja *pheB* geenid kodeerivad vastavalt fenooli monooksügenaasi ja katehool 1,2-dioksügenaasi ning võimaldavad *P. putida* tüvel PaW85 fenooli süsinikuallikana kasutada (Nurk jt., 1991). Käesolevas töös kasutasime PaWterphe2 tüve, kus promootorita *pheBA* geenid paiknesid lookuses PP4519.

Uurimaks rekombinatsiooniprotsesse kromosoomi erinevate osade vahel, on testsüsteemi teine osa viidud samuti kromosoomi. See osa sisaldab lookuses PP5127 funktsionaalse promootori P_{tac} kontrolli all olevat *pheA* geeni, mis on muudetud mittefunktsionaalseks +2 raaminihke mutatsiooniga. P_{tac} on konstitutiivne hübriidpromootor, mis sisaldab *lac* operoni promootori -10 regiooni ja *trp* operoni promootori -35 regiooni ja toimib tugevamalt, kui kumbki promootor eraldi (de Boer jt., 1982). Eeldasime, et +2 raaminihke kõrvaldamine ja seeläbi fenoolil kasvamise võimaldamine toimub HR-i teel +2 raaminihkega *pheA* geeni ja korrektse promootoriga *pheBA* operonis sisalduva *pheA* geeni vahel. Eelnevalt on kontrollitud, et +2 raaminihke reverteerumise sagedus mutatsiooni tagajärjel on väga madal ja ei varjuta rekombinatsiooniliste sündmuste detekteerimist.



Joonis 7. Testsüsteem homoloogilise rekombinatsiooni uurimiseks *P. putida* kromosoomi erinevate piirkondade vahel.

Joonise osal A on *P. putida* kromosoomi lookuses PP4519 paiknev *pheBA* operon (homoloogilise rekombinatsiooni testsüsteemi esimene osa), mille ees paiknev sinine ala kujutab mittefunktsionaalset promootorit. Joonise B osal on kujutatud lookuses PP5127 paiknev +2 raaminihkega mittefunktsionaalne *pheA* geen töötava P_{tac} promootori all (homoloogilise rekombinatsiooni testsüsteemi teine osa).

7.3 Homoloogilise rekombinatsiooni toimumissageduse määramine

HR sageduse mõõtmiseks loendasime fenooli lagundavaid (Phe⁺) kolooniaid selektiivsöötmele, mis sisaldas süsinikuallikana 2,5 mM fenooli. Kultiveerisime testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* rakke 20-24 tundi 2,3 ml Glc-CAA vedelsöötmes temperatuuril 30°C. Seejärel plaatisime sõltuvalt tüvest 10-50 µl rakke koos taustarakkudega selektiivsöötmele. Taustarakkudena kasutasime *P. putida* tüve PaW85 rakke ja lisasime neid 200-240 µl, et kõikidele tassidele saaks koos testtüvedega võrdne kogus rakke. Tasse inkubeerisime temperatuuril 30°C ning jälgisime Phe⁺ kolooniate teket 9 päeva jooksul. Phe⁺ kolooniate tekkesageduse arvutasime 10⁹ elusraku kohta. Elusrakkude hulga teadasaamiseks tegime samadest kultuuridest 10⁷ kordsed lahjendused Glc ja LB tassidele. Tasse inkubeerisime üleöö temperatuuril 30°C ja arvutasime elumuse kolooniaid moodustavate rakkude CFU (*Colony Forming Units*) arvukuse alusel vähemalt neljast sõltumatust bakterikultuurist, kasutades valemit:

$$\text{elusrakkude arv} = \frac{\text{kolooniate arv} * \text{lahjendusfaktor}}{\text{plaaditud kogus (ml)}}$$

HR toimumissageduse arvutamiseks kasutasime valemit:

$$\text{Rekombinatsioonisündmiste arv } 10^9 \text{ raku kohta} = \frac{\text{Phe}^+ \text{ kolooniate arv } 1 \text{ ml kohta}}{\text{elusrakkude arv } 10^9 \text{ raku kohta}}$$

8. Tulemused

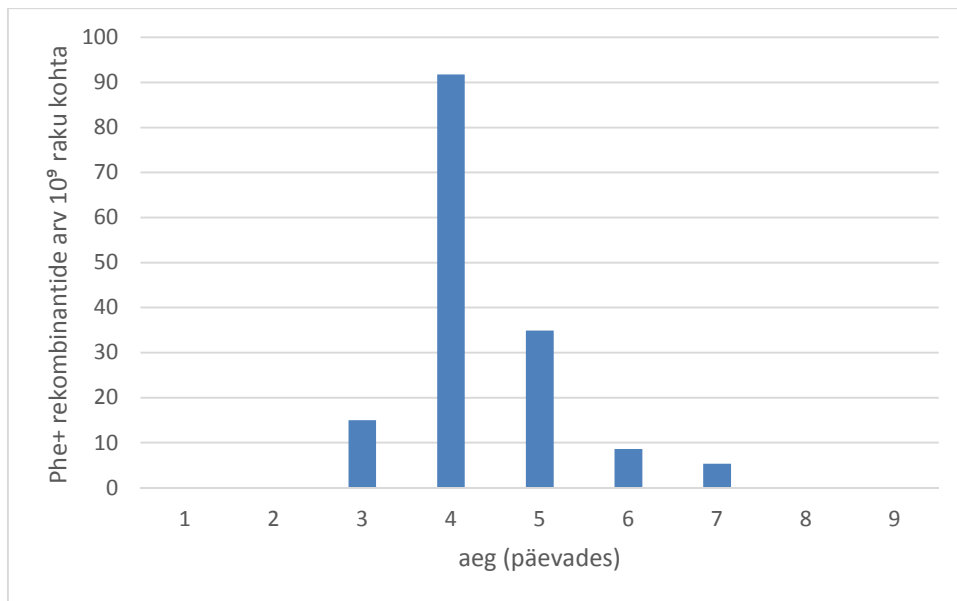
8.1 Kromosoomisiseselt toimuv homoloogilise rekombinatsioon bakteris

Pseudomonas putida

P. putida mittejagunevate ehk statsionaarse faasi rakkudes suureneb endogeensete tegurite, näiteks ROS-ide, poolt põhjustatud DNA kahjustuste hulk (Saumaa jt., 2007, Tarassova jt., 2009), sest reparatsioonisüsteemid ei toimi stressitingimustes korrektselt. Arvatakse, et nälgivates rakkudes kuhjuvad ssDNA katked ning tõuseb rekombinatsioonilise reparatsiooni sagedus (Mikkel, 2008, magistritöö). Samuti võimaldab HR parandada deletsioonide või insertioonide tulemusel mittefunktsionaalseks muutunud geene, kui rakus on olemas korrektne geeniversioon.

Käesolevas töös mõõtsime HR-i sagedust kasvavates ja nälgivates *P. putida* rakkudes bakteri kromosoomis, kasutades eelpoolkirjeldatud kaheosalist testsüsteemi (Joonis 7).

HR-i sageduse mõõtmiseks viisime *P. putida* testertüve CHR5127 (vt. Materjal ja meetoodika ning tabel 3) rakud fenooli sisaldavale selektiivsöötmele vastavalt Materjal ja meetoodika osas kirjeldatud protokollile ja loendasime 9 päeva jooksul selektiivsöötmele ilmunud Phe⁺ rekombinantide kolooniaid. Joonisel 8 on esitatud Phe⁺ rekombinantide arvukus testertüve populatsioonis arvatuna 10⁹ elusraku kohta. Phe⁺ kolooniate tekkesagedus on suurem katse alguses (peamiselt 4.-5. päeval), mis on erinev Tavita jt. artiklis kirjeldatust. Kromosoomi ja plasmidi vahel tekib Phe⁺ kolooniaid rohkem alles bakterite pikaajalises nälgimisel (Tavita jt., 2012). Kuna on teada, et kromosoomisiseselt toimunud HR-i tulemusena saadud Phe⁺ rekombinantidel kulub antud tingimustel kolooniate nähtavale tulekuks ligikaudu 4 päeva (J. Sidorenko avaldamata andmed), siis viitavad joonisel 8 esitatud tulemused sellele, et põhiosa kromosoomisiseselt toimuvaid rekombinatsioonilisi sündmusi toimus kasvavates rakkudes, enne nende plaatimist selektiivsöötmele.



Joonis 8. Phe⁺ kolooniate arv fenooli sisaldaval minimaalsöötmel 10⁹ raku kohta.

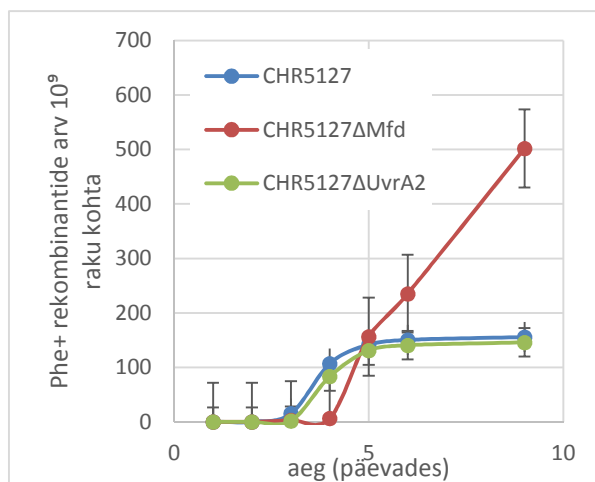
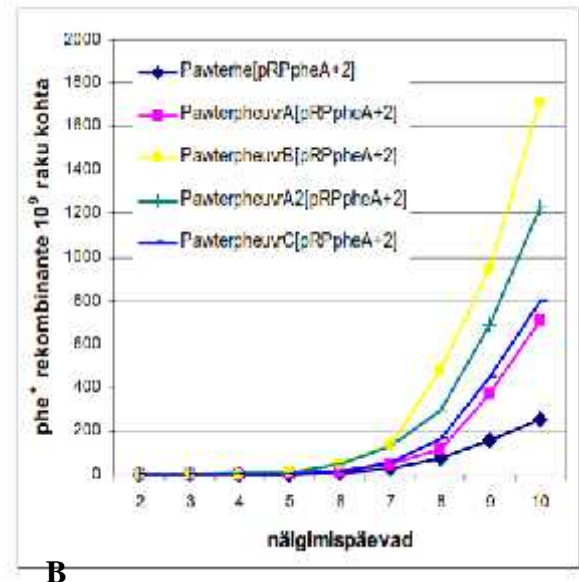
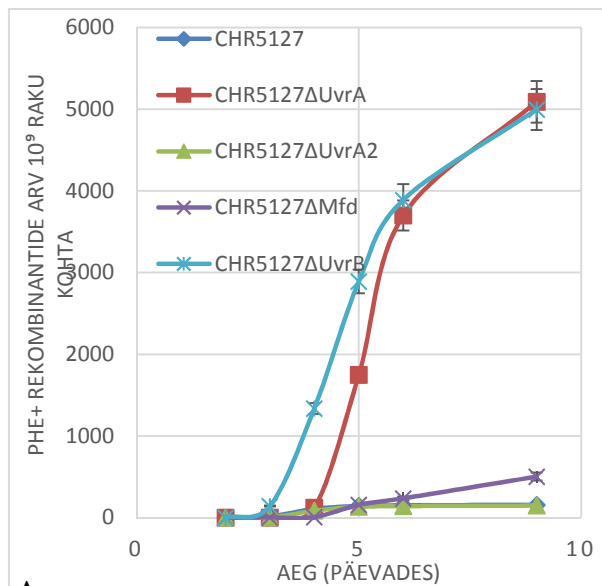
Joonisel on kujutatud tekkinud Phe⁺ kolooniate arv päevade kaupa. Kõige enam tekkis Phe⁺ rekombinante 4. päeval. Tulemused on arvutatud 10⁹ elusraku kohta 60 sõltumatu kultuuri mediaanväärtusena.

8.2 NER-i valkude mõju rekombinatsiooni toimumissagedusele

E. coli rakkudes on näidatud nukleotiidi väljalõike reparatsiooni (NER) pärssivat mõju rekombinatsiooni toimumisele (Courcelle jt., 2005). *E. coli* rakkudes kuuluvad NER süsteemi UvrA, UvrB ja UvrC valgud, millest DNA kahjustuse äratundmise eest vastutavad UvrA ja UvrB valgud ning katked kahjustusest nii 3' kui 5' suunas tekitab endonukleas UvrC (Truglio jt., 2005). UvrA2 on *P. putida* genoomis sisalduv UvrA homoloog (www.pseudomonas.com), mille funktsioonidest on seni vähe teada.

NER süsteemi valkude mõju uurimiseks *P. putida* kromosoomisiseselt toimuvale HR-le konstrueerisime testertüve CHR5127 baasil UvrA, UvrA2, UvrB ja Mfd suhtes defektsed tüved. Joonisel 9 A on näha, et HR-i sagedus suurenes ligikaudu 30 korda UvrA ja UvrB ensüümide defektsuse korral. Võrreldes algse testertüvega CHR5127 nägime Phe⁺ rekombinantide hulga suurenemist ka Mfd defektsuse korral ja seda just alates 6. nälgimispäevast (Joonis 9 C). Samas UvrA2 suhtes defektse tüve puhul me olulisi erinevusi ei näinud (Joonis 9 C). UvrA2 defektses tüves tekkis ~150 rekombinanti 10⁹ elusraku kohta (sama tulemus ka algse testertüvega CHR5127). Sellest võib järeldada, et statsionaarse faasi rakkudes UvrA2 ei mõjuta kromosoomi erinevate osade vahelist rekombinatsiooni.

Võrdluseks on siinkohal ära toodud ka K. Mikkeli magistritöös saadud tulemused HR-i sageduse kohta plasmidi ja kromosoomi vahel (Joonis 9 B). Selles katses erinevad NER-i valkude puudumisest põhjustatud efektid sellest, mida nägime käesolevas töös, kus uurisime nende valkude mõju kromosoomisisesele HR-le. Nimelt on suurenenud käesolevas töös UvrA ja UvrB valkude puudumisel HR märksa enam võrreldes sellega, kui jälgiti HR-i toimumist plasmidi ja kromosoomi vahel. Samas olid K. Mikkeli magistritöös kasutatud NER valkude suhtes defektsed tüved konstrueeritud, katkestades geene antibiootikumidele resistentsusgeenidega, mis võis mõjutada katsete tulemust ja oleks korrektsem neid tulemusi võrrelda siis, kui võrdluskatsed oleksid tehtud mõlema testsüsteemiga korraga.



C

Joonis 9. HR-i sagedus NER valkude suhtes defektsetes *P. putida* tüvedes kromosomaalse tesüsteemi puhul.

Rekombinatsiooni tulemusena tekkinud Phe⁺ rekombinantide hulk phe minimaaltassidel erinevate NER valkude suhtes defektsetes *P. putida* tüvedes ja algses tiives kromosoomisiseselt toimivat HR-i tuvastava testsüsteemi puhul (A, C) ning plasmidi ja kromosoomi vahelist HR-i tuvastava testsüsteemi puhul (B). Graafikutel on igal järgneval päeval selektiivsöötmel ilmunud Phe⁺ kolooniate arv liidetud eelnevate loenduspäevade jooksul ilmunud kolooniate arvule. Tulemused on arvutatud 10⁹ raku kohta ja vähemalt 40 katse tulemuste põhjal. Tulemustele on antud 95% usalduspiirid. Joonise B osa andmed pärinevad K. Mikkeli magistritööst.

Arutelu

Kasvu piiravates stressitingimustes võivad bakterid mutatsioonide, rekombinatsiooni ja horisontaalse geeniülekanne abil kiiresti evolutsioneeruda. Rekombinatsiooniprotsessidel on selles kõiges suur osa. Käesolevas töös selekteerisime rekombinante fenooli sisaldavatel minimaalsöötmetel. Fenool on bakteritele toksiline, sest kahjustab raku membraani ja häirib seetõttu raku elutegevust (Dominguez- Cuevas jt., 2006, Ramos jt., 2002, Sikkema jt., 1995). *P. putida* on mullabakter, kellele on aromaatsete ühendite tolereerimiseks välja kujunenud erinevad süsteemid, mis (1) muudavad rakumembraani permeaablust, (2) restruktureerivad rakumembraani kahjustuste minimeerimiseks ja (3) eemaldavad aktiivselt kahjulikke ühendeid rakust (Wery ja de Bont, 2004). Meie laboris varem läbi viidud HR-i katsetes ilmnas, et HR-i sagedus suurenes *P. putida* rakkude pikaajalisel nälgimisel fenooli juuresolekul ilmselt tänu sellele, et statsionaarse faasi bakterites suurendab fenool reaktiivsete hapnikuühendite kogunemist rakku, mistõttu suureneb DNA-s lämmastikaluste ja suhkrujäägi kahjustuste ning DNA ahela(te) katkete hulk (Tavita jt., 2012).

Rekombinatsioonilist reparatsiooni kasutatakse enamasti ühe- ja kaheahjaliste katkele parandamiseks (Kowalczykowski, 2000), mis võivad tekkida nii DNA replikatsiooni kui ka teiste reparatsioonisüsteemide (nt BER ja NER) käigus (Kuzminov, 1999, Ho jt., 2007, Friedberg jt., 2006).

NER-süsteemi kuuluvad valgud UvrA, UvrB, UvrC, UvrD ja Mfd. Bakteril *P. putida* esineb lisaks veel UvrA2, mis on UvrA homoloog. On näidatud, et UvrA ja UvrB suruvad rekombinatsiooni maha, sest (1) UvrA seostumine DNA-le tekitab UvrA-DNA kompleksi, mis võib ära hoida dsDNA katkete teket või inhibeerida rekombinatsiooni initsiatsiooni, (2) UvrAB kompleks on helikaasse aktiivsusega ja viib rekombinatsiooni vaheühendi lagunemisele (Hanada jt., 2000).

Käesolevas töös uurisime nukleotiidi väljalõike reparatsiooni (NER) valkude mõju homoloogilisele rekombinatsioonile, mis toimub kromosoomisiseselt. Selleks kasutasime kromosomaalset testsüsteemi, mida on kirjeldatud peatükis 6.2.

Katsetulemused viitasid sellele, et kahe samas kromosoomis paikneva osa vahel toimuva homoloogilise rekombinatsiooni sagedus oli suurem kasvavates rakkudes, või rakkudes, mis olid alles lühiajaliselt statsionaarses faasis olnud (Phe⁺ rekombinante ilmus selektiivsöötmele kõige rohkem 2-4 päeval) (Joonis 8). Samas kromosoomi ja plasmidi vahel toimuva HR-i sagedus suurenes bakterites, mis olid mitu päeva fenooli sisaldaval minimaalsöötmel nälginud (Tavita jt., 2012). Kui kromosoomisese HR-i puhul langes järsult uute Phe⁺ kolooniate akumulatsioon selektiivsöötmele pärast 5. päeva (Joonis 8), siis kromosoom-plasmiid süsteemis hoopis võimendus uute Phe⁺ rekombinantide teke rakkude pikaajalisel nälgimisel (Tavita jt., 2012). Sellest saab järeldada, et bakterirakud püüavad esmalt parandada DNA katkeid rakusiseseid matriitse kasutades, pikaaegsel nälgimisel on aga vastuvõtlikumad kromosoomi-välistele matriitsidele (nt plasmid).

Töö teises osas uuritud NER-süsteemi valkudest suurendasid Phe⁺ rekombinantide teket kõige enam UvrA ja UvrB suhtes defektsed tüved ligikaudu 30 korda võrreldes algse tüvega CHR5127. See ühtib Hanada jt. (2000) saadud tulemuse ja oletusega, et UvrA ja UvrB suruvad oma funktsioonidega rekombinatsioonilist reparatsiooni maha (eelpool kirjeldatud). Plasmidsest ja kromosomaalsest komponendist koosneva testsüsteemi puhul suurendas UvrA ja UvrB defektsus vastavalt 3 ja 6 korda Phe⁺ rekombinantide teket. Joonisel 9 B on näha, et kromosomaalse ja plasmidse osa vahelisel homoloogilisel rekombinatsioonil on *P. putida* olulisemaks Phe⁺ rekombinantide arvu suurendajaks ka UvrA2 defektsus. Käesolemas töös kasutatud testsüsteemi puhul ei mõjutanud aga UvrA2 defektsus Phe⁺ rekombinantide tekkesagedust (joonis 9 A). Selle põhjal võib oletada, et UvrA2 tähtsus kromosoom-plasmiid rekombinatsiooniprotsessis on suurem.

Lisaks uurisime ka Mfd valgu mõju HR-le. Bakterites toimuv TCR-is (*transcription coupled repair*) osalev valk Mfd aitab tuvastada DNA katke tõttu peatunud RNA-polümeraasi, lükkab seda DNA-l edasi kuni RNA polümeraas saab DNA-lt eemalduda ning interakteerub UvrA-ga, aidates nii kaasa NER-i initsiatsioonile (Park jt, 2002; Savery, 2007). Varem ei ole uuritud Mfd mõju HR-le. Meie tulemused näitasid, et Mfd defektsuse korral suurenes Phe⁺ rekombinantide hulk selektiivsöötmetel pärast 5-6 päeva. Phe⁺ rekombinantide

hilisem ilmumine selektiivsöötmele võib olla põhjustatud Mfd-defektse tüve rakkude aeglasemast kasvust. Samas, kuna 9. päevaks oli selektiivsöötmel võrreldes algse tüvega ligikaudu 3 korda rohkem rekombinante, viitavad käesoleva töö tulemused sellele, et Mfd puudumine soodustab HR-i toimumist. Kuna kromosomaalsest ja plasmiidsest osast koosneva testsüsteemiga ei ole Mfd osalust rekombinatsioonis veel uuritud, siis ei saa siinkohal võrdlust tuua.

Selleks, et paremini mõista NER-süsteemi valkude mõju HR-le, tuleks valmistada ka topelt-defektsed (UvrA ja UvrB, UvrA2 ja UvrB jne) tüved ning uurida nende mõju HR-i toimumissagedusele mõlema testsüsteemiga. Lisaks tuleks täpsemalt uurida UvrA2 osalust kromosomaalse ja plasmiidse osa vahelises HR-is seoses pikaaegse näljastressiga.

Meie testsüsteemis oli +2 raaminihkega mittefunktsionaalset *pheA* geeni sisaldav osa paigutatud PP5127 lookusesse. Saamaks teada, kui palju mõjutab kromosoomi eri osade vahelist HR-is osalevate lookuste vaheline kaugus ja kromosoomi struktuur, tuleks võrrelda HR-i sagedust tüvedes, milles mittefunktsionaalne *pheA* geen või promootorita *pheBA* operoni asukoht on meie kasutatud tüvedest erinevad.

Kokkuvõte

DNA kahjustusi põhjustavad nii ekso- kui endogeensed tegurid. DNA kahjustuste kõrvaldamiseks ja seeläbi mutatsioonide ärahoidmiseks on bakterirakkudes välja kujunenud mitmed reparatsioonimehhanismid, mis on võimelised üksteist soodustama või pärssima. Käesolevas töös võtsime vaatluse alla nukleotiidi väljalõike reparatsiooni (NER) valkude mõju homoloogilisele rekombinatsioonile (HR). Varasemalt on NER-i valkude mõju rekombinatsioonile uuritud peamiselt kasvavates rakkudes. Kuna bakterid on loodulikus keskkonnas aga enamasti stressitingimustes, on oluline uurida HR toimumist statsionaarse faasi rakkudes. Kirjanduse ülevaates on välja toodud NER-i ja HR-i protsesside etapid ja nendes osalevate valkude funktsioonid.

Meie laboris on varem uuritud *mismatch*-reparatsiooni (MMR) (Tavita jt., 2012) ja NER valkude (K. Mikkil, magistratöö) mõju HR-le *Pseudomonas putida* statsionaarse faasi rakkudes, kuid seda üksnes kromosomaalsest ja plasmiidsest osast koosneva testsüsteemiga.

Käesolevas töös kasutasime HR-i uurimiseks kromosomaalset testsüsteemi, mis võimaldas vaadelda kromosoomi erinevate osade vahelise HR-i toimumise sagedust. Et NER on üks raku olulisemaid DNA reparatsioonimehhanisme, siis uurisime ka NER-i valkude mõju rekombinatsioonisagedusele.

Katsetulemuste kokkuvõte on järgnev:

- 1) *P. putida* rakkudes pärssivad homoloogilist rekombinatsiooni NER-süsteemi valkudest kõige enam UvrA ja UvrB.
- 2) Võrreldes kromosomaalse ja plasmiidse osa vahel toimuvate HR-protsessidega saab välja tuua:
 - a. Kui HR-i sagedus kromosoomi piires on suurem kasvavates või ainult lühiajaliselt statsionaarses faasis olnud rakkudes, siis kromosoomi ja plasmidi vaheline rekombineerumine võimendub alles rakkude pikaajalisel nälgimisel
 - b. Kromosomaalse ja plasmiidse osa vahelise HR-i mahasurumises on oluline osa UvrA2 valgul, mis aga kromosoomisest rekombinatsiooni ei mõjuta.

Summary

Effects of NER proteins to homologous recombination in the chromosome of *Pseudomonas putida*

Marge Arge

DNA damage can be caused by exo - or endogenous factors. For eliminating DNA damage, and thereby to prevent the mutations, bacteria have developed several DNA repair-systems, which can promote or suppress each another. In this work, we focussed on effects of nucleotide excision repair (NER) proteins to homologous recombination (HR). Previous studies have described the effects of NER proteins to HR in growing cells. As in natural environment bacteria spend most of the time under stress, it is important to study the occurrence of HR in stationary phase cells. The literature review of this study gives an overview of the process of NER and HR and describes the functions of participating proteins.

In our research group the effects of mismatch repair (MMR) (Tavita et al., 2012) and NER proteins (K. Mikkelsen, master thesis) to HR in stationary phase population of *Pseudomonas putida* have been studied with a test system consisted of chromosomal and plasmidial parts.

In the present work a test system is used where both parts are located in the chromosome. This allows observation of the frequency of intrachromosomal recombination. NER pathway is one of the most important DNA repair pathways for the removal of DNA lesions and therefore we studied the effects of NER proteins to intrachromosomal recombination in starving *P. putida* cells.

The results of this study can be summarized as follows:

- 1) In *P. putida* cells HR is inhibited by UvrA and Uvr B proteins of the NER system.
- 2) In comparison with extrachromosomal HR:
 - a. the frequency of intrachromosomal recombination is higher in growing cells or in cells that have been only shortly in stationary phase, whereas in continuing starvation the frequency of the events of extrachromosomal recombination increases.
 - b. Although the extrachromosomal recombination is suppressed by UvrA homologue UvrA2, this enzyme does not have any effect on intrachromosomal HR.

Kirjanduse loetelu

- Adams, M.H. (1959).** Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. N. Y. 445-447.
- Aniukwu, J., Glickman M. S., Shuman, S. (2008).** The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ-depend on the structure of the broken DNA ends. *Genes Dev.* 22: 512-527.
- Aravind, L., Koonin, E. V. (2001).** Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res.* 11: 1365–1374.
- Baath, E. (1998).** Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. *Microb. Ecol.* 36: 316-327.
- Bauchop T., Elsdén, S.R. (1960).** The growth of microorganisms in relation their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23: 469-475.
- Bianco, P.R., Kowalczykowski, S. C. (2001).** RecA Protein. In *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London, <http://www.els.net>.
- Bichara, M., Pinet, I., Origas, M., Fuchs, R.P.P. (2006).** Inactivation of RecG stimulates the RecF pathway during lesion-induced recombination in *E. coli*. *DNA Repair* 5: 129-37.
- Birge, E. A, Low, K. B. (1974).** Detection of transcribable recombination products following conjugation in *rec⁺*, *recB⁻* and *recC⁻* strains of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 83: 447-457.
- Bowater, R., Doherty, A. J. (2006).** Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.* 2: e8.
- Bridges, B. A. (1998).** The role of DNA damage in stationary phase ('adaptive') mutation. *Mutat. Res.* 408: 1-9.

- Brissett, N. C. & Doherty, A. J. (2009).** Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 539–545.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J. (2000).** Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol.* 3: 3-8.
- Courcelle, C.-T., Belle, J.J., Courcelle, J. (2005).** Nucleotide excision repair or polymerase V-mediated lesion bypass can act to restore UV-arrested replication forks in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 6953–6961.
- Courcellec, J., Khodurskya, A., Peterb, B., Brown, P. O. and Hanawalt, P. C., (2001).** Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 1: 41-64.
- Cox, M. M. (2007).** Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42: 41-63.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983).** The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 21-25.
- Delagoutte, E., Fuchs, R. P., Bertrand-Burggraf, E. (2002).** The isomerization of the UvrB-DNA preincision complex couples the UvrB and UvrC activities. *J. Mol. Biol.* 320: 73-84.
- Della, M., Palmbos, P. L., Tseng, H.-M., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Topper, L. M., Pitcher, R. S., Tomkinson, A. E., Wilson, T. E. & Doherty, A. J. (2004).** Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science* 306: 683–685.
- DellaVecchia, M.J., Croteau, D.L., Skorvaga, M., Dezhurov, S.V., Lavrik, O.I., and Van Houten, B. (2004).** Analyzing the handoff of DNA from UvrA to UvrB utilizing DNA-protein photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 279: 45245–45256.
- Dillingham, M. S. & Kowalczykowski, S. C. (2008).** RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 642–671.

Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275: 331-342.

Doherty, A. J., Jackson, S. P., Weller, G. R. (2001). Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Lett.* 500, 186.

Domonquez- Cuevas, P. Gonzalez- Pastor, J. E., Marques, S., Ramos, J. L., de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem* 281: 11981-11991.

Eggleston A.K., West S.C. (2000). Cleavage of holliday junctions by the *Escherichia coli* RuvABC complex. *J. Biol. Chem.* 275: 26467–26476.

El Karoui, M., Biaudet, V., Schbath, S., Gruss, A. (1999). Characteristics of Chi distribution on different bacterial genomes. *Res. Microbiol.* 150 (9): 579-587.

Fernandez de Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., Ohmori, H. and Woodgate, R. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA- regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6: 1560–1572.

Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M. and Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (6): 1105-1121.

Foster, P. L. (1999). Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu. Rev. Genet.* 33: 57-88.

Fromme, J. C., Banarjee, A., Verdine, G. L. (2004). DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 43-49.

Friedberg, E. C., Hanawalt, P. C. (Eds.) (1984). DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures, Vols. 1-3. Marcel Dekker, Inc., New York.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T. (2006). DNA Damage, p. 15-22, Base Excision Repair, p. 169-173, Mismatch Repair, p.416-419, Recombinational Repair, Replication Fork Repair, and DNA Damage Tolerance, p.569-612. DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, D.C.

- Hall, B. G. (1995).** Genetics of selection-induced mutations: I. *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, and *uvrD* are selection-induced specific mutator loci. *J. Mol. Evol.* 40: 86-93.
- Hanada, K., Iwasaki, M., Ihashi, S., Ikeda, H. (2000).** UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination: Synergistic action with RecQ helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(11): 5989- 5994.
- Hanawalt, P.C., Spivak, G. (2008).** Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 958-970
- Hartman, A. R., Ford, J. M. (2002).** BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat. Genet.* 32: 180-4.
- He, A.S., Rohatgi, P.R., Hersh, M.N., Rosenberg, S.M. (2005).** Roles of *E. coli* double-strand-break-repair proteins in stress-induced mutation. *DNA Repair* 5: 258-273.
- Heyer, W.-D. (2004).** Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Current Biol.* 14: 56-58.
- Ho, E.L.Y., Parent, M., Satoh, M.S. (2007).** Induction of base damages representing a high risk site for double-strand DNA break formation in genomic DNA by exposure of cells to DNA damaging agents. *J. Biol. Chem.* 282(30): 21913–21923.
- Hoffmann, G. R. (1992).** Bacterial assays for recombinagens. *Mutat. Res.* 284: 125-146.
- Kanamitsu, K., Ikeda, S. (2010).** Early steps in the DNA base excision repair pathway of a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Nucleic Acids.* 2010.
- Kasak, L., Kivisaar, M., Hórák, R. (1997).** Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: A model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3134– 3139.
- Kim, J.J., Sundin, G.W. (2001).** Construction and analysis of photolyase mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: contribution of photoreactivation,

nucleotide excision repair, and mutagenic DNA repair to cell survival and mutability following exposure to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1405–1411.

Kivisaar, M. (2010). Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads. *FEMS Microbiol. Letters* 312: 1-14.

Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends. Biochem. Sci.* 25: 156-165.

Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., Rehrauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58: 401-465.

Krwawicz, J., Arczewska, K. D., Speina, E., Maciejewska, A., Grzesiuk, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim. Pol.* 54: 413-434.

Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 751–813.

Lanka, E., Pansegrau, W. (1999). Genetic exchange between microorganisms, p. 408- 415. In J. W. Lengeler, G. Drews, H. G. Schlegel (ed.), *Biology of the Prokaryotes*, Blackwell Science, Stuttgart.

Layton, J.C., Foster, P.L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stressresponse sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 50(2): 549–561.

Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J., Sarasin, A. (2000). BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res.* 60, 5548-52.

Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair* 3: 817–826.

Lin, J. J., Sancar, A. (1989). A new mechanism for repairing oxidative damage to DNA: (A)BC excinuclease removes AP sites and thymine glycols from DNA. *Biochemistry*. 28: 7979-7984.

Matson, S.W. Robertson, A.B. (2006). The UvrD helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res.* 34(15): 4089-4097.

Mikkel, K. (2008). Magistritöö „Rekombinatsiooniprotsesse mõjutavad mehhanismid *Pseudomonas putida* statsionaarse faasi rakkudes“

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour Press, N.Y.

Moolenaar GF, Uiterkamp RS, Zwijnenburg DA, Goosen N. (1998). The C-terminal region of the *Escherichia coli* UvrC protein, which is homologous to the C-terminal region of the human ERCC1 protein, is involved in DNA binding and 5'-incision. *Nucleic Acids Res.* 26(2): 462-8.

Nowosielska, A. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. *Acta Biochimica Polonica* 54(3): 483-494.

Nurk, A., Kasak, L., Kivisaar, M. (1991). Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene*. 102: 13-18.

Orren, D. K., Sancar, A. (1989). The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 5237-5241.

Orren, D.K., Selby, C. P., Hearst J.E., Sancar A. (1992). POST-INCISION steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.* 267:780–8

- Park, J.-S., Marr, M. T., Roberts, J. W. (2002).** *E. coli* Transcription Repair Coupling Factor (Mfd Protein) Rescues Arrested Complexes by Promoting Forward Translocation. *Cell* 19(6): 757-767.
- Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M. and Goodman, M. F. (2010).** A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 3: 171-184.
- Pitcher, R. S., Brissett, N. C., Doherty, A. J. (2007).** Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:259-282.
- Posnick, L. M., Samson, L. D. (2001).** DNA repair. *Enc. Of Life Sci.*
- Poulsen, L. K., Licht, T. R., Rang, C., Krogfelt, K. A., Molin, S. (1995).** Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *J. Bacteriol.* 177: 5840-5845
- Ramos, A., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos- Gonzales, M. I., Rojas, A., Teran, W., Segura, A. (2002).** Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 56, 743-768.
- Reardon, J. T., Sancar A. (2005).** Nucleotide excision repair. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Bio.* 79: 183-235.
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strompl, C., Moore, E. R., Timmis, K. N. (2002).** Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 912-915.
- Rocha, E. P. C., Cornet, E., Michel, B. (2005).** Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PloS Genet.* 1: 247-259.
- Rosenberg, S.M., Thulin, C., Harris, R., S. (1998).** Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics.* 148:1559-66.

- Sancar, A., Reardon, J. T. (2004).** Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. Adv. Protein Chem. 69: 43-71.
- Savery, N. J. (2007).** The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. Trends in Microbiol. 15(7): 326-333.
- Saumaa, S., Tover, A., Kasak, L., Kivisaar, M. (2002).** Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS. J. Bacteriol. 184(24): 6957-6965.
- Saumaa, S., Tover, A., Tark, M., Tegova, R., Kivisaar M. (2007).** Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 189: 5504-5514.
- Sibghat-Ullah, Sancar, A., Hearst, J.E. (1990).** The repair patch of *E. coli* (A)BC excinuclease. Nucleic Acids Res. 18: 5051-5053.
- Sidorenko, J. (2010).** Magistritöö „DNA polümeraas I funktsioonide uurimine *Pseudomonas putida* rakkudes“.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., Poolman, B. (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59: 201-222.
- Shuman, S., Glickman, M. S. (2007).** Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. Nat. Rev. Microbiol. 5:852-861.
- Zahradka, K., Šimi, S., Buljubaši, M., Petranovi, M., Đermi, D., Zahradka, D. (2006).** *sbcB15* and *sbcB* mutations activate two types of RecF recombination pathways in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 188(21): 7562-7571.
- Zharkov, D. O. (2008).** Base excision DNA repair. Cell. Mol. Life Sci. 65: 1554-1565.

- Zou, Y., Liu, T.M., Geacintov, N.E., and Van Houten, B. (1995).** Interaction of the UvrABC nuclease system with a DNA duplex containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-BPDE, *Biochemistry*, 34, 13582–13593.
- Tarassova, K., Tegova, R., Tover, A., Teras, R., Tark, M., Saumaa, S., Kivisaar, M. (2009).** Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved RpoS-deficient *Pseudomonas putida* is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase. *J. Bacteriol.* 191:3604-14.
- Tark, M. (2006).** Magistritöö „DNA reparatsioon *Pseudomonas putida* rakkudes“.
- Tark, M., Tover, A., Koorits, L., Tegova, R., Kivisaar, M. (2008).** Dual role of NER in mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair*. 7: 20-30.
- Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Hõrak, R., Kivisaar, M. (2005).** A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *J. Bacteriol.* 187: 5203-5213.
- Tavita, K., Mikkil, K., Tark-Dame, M., Jerabek, H., Teras, R., Sidorenko, J., Tegova, R., Tover, A., Dame, R. T., Kivisaar, M. (2012).** Homologous recombination in facilitated in starving populations of *Pseudomonas putida* by phenol stress and affected by chromosomal location of the recombination target. *Mutat. Res.* 737:12-24.
- Truglio, J.J., Rhau, B., Croteau, D.L., Wang, L., Skovvaga, M., Karakas, E., DellaVecchia, M.J., Wang, H., Van Houten, B., Kisker, C. (2005).** Structural insights into the first incision reaction during nucleotide excision repair. *EMBO J.* 24: 885–894.
- Van Houten, B., Croteau, D. L., DellaVecchia, M. J., Wang, H., Kisker, C. (2005).** 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutat. Res.* 577: 92-117.
- van Hoffen, A., Balajee, A. S., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. F. (2003).** Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology*. 193: 79-90.

- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Cam, E.L., Matic, I., Fabre, F., Petit, M.-A. (2005).** UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. EMBO J. 24: 180–189.
- Weller, G. R., Doherty, A. J. (2001).** A family of DNA repair ligases in bacteria? FEBS Lett. 505: 340–342.
- Wery, J., De Bont, J. A. M. (2004).** Solvent-tolerance of Pseudomonads: a new degree of freedom in biocatalysis. In Pseudomonas: Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism, pp. 609-634. Edited by J. L. Ramos. New York: Kluwer Academy/Plenum Publishers
- West, S.C. (1996).** The RuvABC proteins and Holliday junction processing in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178: 1237–1241.
- West, S.C., van Gool, A.J., Shah, R., Mézard, C. (1998).** Functional interactions between the Holliday junction resolvase and the branch migration motor of *Escherichia coli*. EMBO J. 17: 1838–1845.
- Wyman, C., Ristic, D., Kanaar, R. (2004).** Homologous recombination-mediated double-strand break repair. DNA Repair 3: 827-833.
- Yeiser, B., Pepper, E. D., Goodman, M. F. and Finkel, S. E. (2002).** SOS induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99: 8737–8741.

Kasutatud veebileheküljed

www.pseudomonas.ee

Lihtlitsents

Mina, **Marge Arge** (sünnikuupäev: **13.11.1989**)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

NER-i valkude osa homoloogilise rekombinatsiooni toimumisel *Pseudomonas putida* kromosoomis

mille juhendajad on **MSc Julia Sidorenko, Ph.D Maia Kivisaar**

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus,

(kuupäev)
